

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003508

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-057373
Filing date: 02 March 2004 (02.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 5 7 3 7 3

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

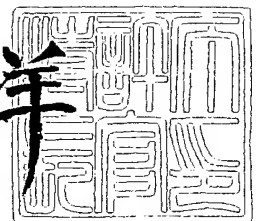
J P 2 0 0 4 - 0 5 7 3 7 3

出 願 人
Applicant(s): ゾイジーン株式会社

2 0 0 5 年 4 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 J11443
【提出日】 平成16年 3月 2日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 1/14
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 ゾイジーン株式会社
 社内
 【氏名】 芳山 美子
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 ゾイジーン株式会社
 社内
 【氏名】 古賀 裕久
【特許出願人】
 【識別番号】 502262469
 【氏名又は名称】 ゾイジーン株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100103997
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長谷川 暁司
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 035035
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

無細胞タンパク質合成用細胞抽出液製造法であって、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液を、アフィニティ担体と接触させる工程を含み、該アフィニティ担体は、細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を排除してもタンパク質合成活性が低下しないものであることを特徴とする方法。

【請求項 2】

細胞抽出液が、コムギ胚芽抽出液であって、アフィニティ担体が、金属キレート担体であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

金属キレート担体が、コバルト担体、ニッケル担体、あるいは亜鉛キレート担体のいずれかである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法により製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質を合成するタンパク質合成方法。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質の合成反応を行い、得られた合成反応液を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニティ担体と実質的に同一のものと接触させることを特徴とするタンパク質の精製方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】無細胞タンパク質合成用細胞抽出液製造法

【技術分野】

【0001】

本発明は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造方法、該方法により製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、該細胞抽出液を用いた目的タンパク質合成方法、並びに合成された目的タンパク質の精製方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

タンパク質の合成方法には、生細胞で行う方法と、無細胞タンパク質合成系で行う方法等が知られている。このような合成系で合成されたタンパク質（以下、これを「組換えタンパク質」と称することがある）は、これを適当な方法を用いて精製して利用される。タンパク質の精製方法には、精製するタンパク質の種類によって様々な方法が用いられる。その中で、合成しようとするタンパク質をタグと呼ばれるペプチドとの融合タンパク質として上記の合成系を用いて合成し、該タグペプチドと特異的に結合する物質を固定化したアフィニティ担体により精製する方法が有効に用いられている。

【0003】

組換えタンパク質の利用法として、例えば立体構造解析に用いる場合等は、該タンパク質の精製度は非常に高いものが要求される（例えば非特許文献1を参照）。また機能解析に用いる場合には、組換えタンパク質はより精製度の高いものが求められる。しかし、上記のアフィニティ担体を用いたタンパク質の精製方法を行っても、目的タンパク質が高度に精製されることは少なく、さらに複数の精製を組み合わせる必要がある。

【0004】

このような複数種類の精製法を組み合わせたタンパク質の精製は、操作が煩雑であるだけでなく、各精製工程における目的タンパク質のロスが増加するために、立体構造解析のように多くのタンパク質量を必要とする目的に用いる場合には問題があった。

そこで、これらの問題を解決するために高度な精製効率を有する精製方法が望まれていた。

【非特許文献1】タンパク質・酵素の基礎実験法、南江堂、1981年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、高度な精製効率を有するタンパク質の精製方法を提供することを課題とする。さらに詳細には、高度な精製効率を有する精製方法を実現するための無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、該細胞抽出液を用いるタンパク質合成方法、並びに該細胞抽出液により合成されたタンパク質を精製する高度な精製効率を有する精製方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意検討した結果、無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽抽出液を金属キレート担体に接触させた後に、該金属キレート担体と結合するペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質を該抽出液で合成し、合成反応液を該金属キレートと再度接触させて、該担体に結合したタンパク質を溶出することによれば、目的タンパク質を高度に精製できることを見出し本発明を完成させるに至った。即ち、本発明によれば、

（1）無細胞タンパク質合成用細胞抽出液製造法であって、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液を、アフィニティ担体と接触させる工程を含み、該アフィニティ担体は、細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を排除してもタンパク質合成活性が低下しないものであることを特徴とする方法、

（2）細胞抽出液が、コムギ胚芽抽出液であって、アフィニティ担体が、金属キレート担

体であることを特徴とする上記（１）に記載の方法、

（３）金属キレート担体が、コバルト担体、ニッケル担体、あるいは亜鉛キレート担体のいずれかである上記（２）に記載の方法、

（４）上記（１）～（３）のいずれかに記載の方法により製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、

（５）上記（４）に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質を合成するタンパク質合成方法、

（６）上記（４）に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質の合成反応を行い、得られた合成反応液を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニティ担体と実質的に同一のものと接触させることを特徴とするタンパク質の精製方法、
が、提供される。

【発明の効果】

【0007】

本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液によれば、これを用いて合成したタンパク質を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニティ担体を用いて精製した場合、該タンパク質について非常に高度な精製を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造方法であって、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液を、アフィニティ担体と接触させる工程を含み、該アフィニティ担体は、細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を排除してもタンパク質合成活性が低下しないものであることを特徴とする方法、および該細胞抽出液を用いてタンパク質を合成し、得られた合成反応液を、上記アフィニティ担体を用いて精製することを特徴とするタンパク質精製方法である。これらを以下に詳細に説明する。以下に記載する構成要件の説明は、本発明の実施態様の一例（代表例）であり、これらの内容に特定はされない。

【0009】

（１）無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造

本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造方法は、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液（以下、これを「細胞抽出液」と称することがある）を、アフィニティ担体と接触させる工程を含み、該アフィニティ担体は、細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を排除してもタンパク質合成活性が低下しないものであることを特徴とする方法である。タンパク質合成活性を有する細胞抽出液とは、鋳型核酸、アミノ酸、エネルギー源等を供給することにより無細胞タンパク質合成を行うことができるものを意味し、このような活性があれば何れのものでもよい。具体的には、大腸菌、植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球等の細胞抽出液等が挙げられる。これら無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、市販のものも用いることができるし、それ自体既知の方法、例えば、大腸菌の場合は、Pratt, J. M. et al., Transcription and translation, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., IRL Press, Oxford(1984)等に記載の方法を用いて作製したものでもよい。

【0010】

市販の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液としては、大腸菌由来のものは、E. coli S30 extract system(Promega社製)とRTS 500 Rapid Translation System等を用いることができ、ウサギ網状赤血球由来のものは、Rabbit Reticulocyte Lysate system (Promega社製)等、さらにコムギ胚芽由来のものは、PROTEIOSTM (TOYOBO社製)等を用いることができる。このうち、後述する目的タンパク質の精製に金属キレート担体を用いる場合には、特にコムギ胚芽細胞抽出液が好ましく、さらには、WO 03/064671号公報に記載の方法により調製された細胞抽出液が特に好ましく用いられる。

【0011】

アフィニティ担体は、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から該アフィニティ担体

に結合する物質を排除してもタンパク質合成活性が低下しないものであれば何れのものでよい。また、本発明の製造方法で用いられるアフィニティ担体は、後に合成された目的タンパク質を精製する際にも用いられるので、目的タンパク質を精製し得るものであることが必要である。また、タンパク質合成活性が低下しないとは、タンパク質合成活性が、該細胞抽出液を用いて合成するタンパク質の利用に十分な量を合成し得る程度に保たれることを意味する。さらには、タンパク質合成活性が上昇する場合も含まれる。

【0012】

アフィニティ担体としては、一般的にタンパク質の精製に用いられる担体が挙げられ、例えば、コバルト担体、ニッケル担体等の金属キレート担体、HiTrap cheleting HP（アマシヤム社製）IPAC Metal Chelating Resin（エプロジェン社製）等の金属キレート用担体とニッケルイオン、コバルトイオン、亜鉛イオンなどの金属イオンの組み合わせによる金属キレート担体、抗体結合担体、例えば、抗HA抗体結合担体、抗FLAG抗体結合担体、抗mycタグ抗体結合担体、抗T7抗体結合担体、抗V5抗体結合担体、抗Thioredoxin抗体結合担体、抗CAT抗体結合担体、抗GFP抗体結合担体、抗 β -gal抗体結合担体等が挙げられる。

【0013】

細胞抽出液の合成活性を低下させないアフィニティ担体の選択方法は、下述する方法でアフィニティ担体と細胞抽出液を接触させた（以下、この操作を「吸着」と称することがある）後、下述する方法で該細胞抽出液を用いて目的タンパク質を合成したとき、目的タンパク質の利用に十分な量を合成し得るかを確認することによって選択する方法が挙げられる。また、吸着を行っていない細胞抽出液を用いて目的タンパク質を合成した場合と比較してタンパク質合成効率が著しく低下しなければ、該アフィニティ担体は本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造に用いることができると判断することもできる。

【0014】

このようなタンパク質合成活性を有する細胞抽出液とアフィニティ担体の組み合わせとしては、コムギ胚芽抽出液と金属キレート担体などが挙げられる。ここで、金属キレート担体としては、コバルト担体、ニッケル担体などが挙げられる。さらに具体的には、コバルト担体としてはタロン担体（クロンテック社、BD Bioscience社）等が挙げられ、ニッケル担体としては、Ni-NTA-Agarose（キアゲン社製）、Ni-Sepharose（アマシヤム社製）等が挙げられる。

【0015】

アフィニティ担体とタンパク質合成活性を有する細胞抽出液を接触させる方法としては、上記細胞抽出液中の、アフィニティ担体に結合すべき物質が該担体に結合するに十分な方法であれば特に制限はなく、アフィニティ担体や細胞抽出液の種類に応じて適宜選択することができる。但し、細胞抽出液のタンパク質合成活性が低下しないように行うことは重要である。

【0016】

接触させるアフィニティ担体と細胞抽出液の体積量は、これらの種類によって異なるが、細胞抽出液に対して1/100以上の体積量のアフィニティ担体を用いることが好ましく、さらに好ましくは1/10～10倍の体積量、最も好ましくは1/5～2倍の体積量のアフィニティ担体を用いることが好ましい。

また、接触させる方法は、アフィニティ担体と細胞抽出液を適当な容器中で混合するバッチ法、あるいはアフィニティ担体を適当なカラムに詰めた後に、細胞抽出液を該カラムに添加するカラム法等が挙げられる。カラム法を用いる場合、アフィニティ担体は、予め適当な緩衝液で平衡化しておくことが好ましい。適当な緩衝液とは、用いるアフィニティ担体の種類によって適宜選択されるが、細胞抽出液を添加する前には、該細胞抽出液と同様の緩衝液に交換しておくことが好ましい。

【0017】

接触させる温度は、細胞抽出液中のアフィニティ担体に結合すべき物質が結合できて、かつ細胞抽出液のタンパク質合成活性が低下しない範囲であればよい。具体的には、例えば、0～50℃が好ましく、さらには2～30℃が好ましい。特に細胞抽出液としてコム

ギ胚芽抽出液を用いる場合、好ましくは4～26℃で接触させることが好ましい。接触させる時間は、細胞抽出液中のアフィニティ担体に結合すべき物質が結合できて、細胞抽出液のタンパク質合成活性が低下しない範囲であればよく、具体的には、例えば、1分以上、好ましくは5～100分、さらに好ましくは10～60分である。

【0018】

金属キレート担体を用いる場合には、細胞抽出液中に含まれる還元剤、特にジチオスレイトールの濃度によっては、金属が担体から遊離することがあるが、遊離した金属が、タンパク質合成活性に著しく影響しない限り用いることができる。また、還元剤の濃度を調節したり、他の還元剤を用いること等によってこの金属の遊離を阻害することは有効である。また、金属キレート担体と細胞抽出液を接触させる際に、イミダゾールなどのイミダゾール環を有する化合物またはその誘導体（以下、これを「イミダゾール類」と称することがある）を添加することによれば、上記金属キレート担体に弱く非特異的に結合している物質の吸着が抑えられるため、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液のタンパク質合成活性を保持するために有効である。イミダゾール類の具体的な濃度としては、1 mM以上、好ましくは2～50 mM、さらに好ましくは10～20 mMが挙げられる。

【0019】

また、細胞抽出液とアフィニティ担体との接触は、公知の細胞抽出液の製造工程の全部を経た後だけではなく、細胞からタンパク質合成活性を有する抽出液が抽出された後の何れの工程で行ってもよい。

かくして製造された本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液も本発明の範囲に含まれる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、タンパク質合成に必要な翻訳鋳型、核酸分解酵素阻害剤、各種イオン、基質、エネルギー源等（以下、これを「翻訳反応用添加物」と称することがある）を添加して目的タンパク質合成用システムに付することによりタンパク質合成を行うことができる。また、適当な装置を用いて濃縮した後に、目的タンパク質合成に用いることもできる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、これを凍結させて保存することもできるし、翻訳鋳型及び核酸分解阻害剤以外の翻訳反応用添加物を添加した液（本明細書中ではこれを「レディメイド型細胞抽出液」と称することがある）として保存することもできる。また、特開2000-316594号公報、あるいは特開2002-125693号公報等に記載の方法等を用いて凍結乾燥して保存することもできる。

【0020】

(2) 目的タンパク質の合成

上記で製造した本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、上記の翻訳反応用添加物を添加して目的タンパク質合成用システムに付することによりタンパク質合成を行うことができる。翻訳反応用添加物は、用いる無細胞タンパク質合成用細胞抽出液によって異なるが、公知のものを適宜選択して用いることができる。

【0021】

具体的には、例えば、コムギ胚芽抽出液を用いる場合、翻訳反応溶液としては、鋳型となる核酸、基質となるアミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、ATP再生系、核酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレングリコール、3', 5'-cAMP、葉酸塩、抗菌剤等が含まれる。それぞれ濃度としては、ATPとしては100 μM～0.5 mM、GTPは25 μM～1 mM、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ25 μM～0.4 mM含まれるように添加することが好ましい。ここで、細胞抽出液としてWO 03/064671号公報に記載の方法により調製されたコムギ胚芽抽出液を用いる場合には、通常tRNAの添加は必要無い。

【0022】

タンパク質合成のためのシステム、または装置も、それぞれ選択した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液に適した公知の方法を選択することができる。コムギ胚芽抽出液を用いる場合には、バッチ法(Pratt, J.M. et al., Transcription and Translation, Hames, 179-209, B.D. & Higgins, S.J., eds, IRL Press, Oxford(1984))のように、本発明の無細胞タンパク

質合成用細胞抽出液に無細胞タンパク質合成に必要なエネルギー源やアミノ酸、あるいは tRNA を添加して行う方法や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin, A. S. et al., Science, 242, 1162-1164 (1988))、透析法 (木川等、第 21 回日本分子生物学会、W I D 6)、あるいは重層法 (Sawasaki, T., et al., FEBS Let., 514, 102-105 (2002)) 等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型の RNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する不連続ゲルろ過法 (特開 2000-333673 号公報) 等を用いることができる。また、無細胞タンパク質合成に必要なアミノ酸、エネルギー源等を含むゾルまたはゲルの上部に翻訳反応液を重層して行う方法 (特願 2002-354062 号明細書) を用いることもできる。

【0023】

鋳型となる核酸は、目的タンパク質をコードするものを用いる。目的タンパク質が、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造あるいは後述する目的タンパク質の精製に用いるアフィニティ担体に結合しない場合には、これと結合する能力のあるペプチド (以下、これを「タグ」と称することがある) との融合タンパク質をコードするものを用いる。

【0024】

具体的には、目的タンパク質または目的タンパク質とタグとの融合タンパク質をコードする配列 (以下、これを「ORF」と称することがある) を有し、ORF の上流に、プロモーター配列、翻訳活性増強配列等を有し、下流には停止配列と mRNA の安定性のための非翻訳領域を含むことが好ましい。プロモーター配列は、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、または転写に用いる RNA 合成酵素により適宜選択することができる。具体的には、転写に SP6 RNA 合成酵素を用いる場合には、SP6 プロモーターを用いることが好ましい。翻訳活性増強配列として具体的には、真核生物においては、5' キャップ構造 (Shatkin, Cell, 9, 645-(1976))、コザック配列 (Kizak, Nucleic Acid. Res., 12, 857-(1984)) 等があり、また原核生物においてはシャインダルガーノ配列等が知られている。更には RNA ウィルスの 5' -非翻訳リーダー配列にも翻訳促進活性があることが見出されており (特許第 2814433 号公報)、これらの配列を用いてタンパク質合成を効率よく行う方法が開発されている (特開平 10-146197 号公報)。

【0025】

目的タンパク質は、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いた上記合成法により合成され得るものであれば如何なるものであってもよい。目的タンパク質とタグとの融合タンパク質は、具体的には、例えば、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造および目的タンパク質の精製に金属キレート担体を用いる場合には、ポリヒスチジンタグと目的タンパク質との融合タンパク質等が挙げられる。ポリヒスチジンタグは、目的タンパク質のどこに含まれていてもよいが、好ましくは、目的タンパク質の N 末または C 末に位置するものが挙げられる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造および目的タンパク質の精製に上記 (1) に挙げた抗体結合担体を用いる場合には、その抗原ポリペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質が挙げられる。ここで、該抗体結合担体の抗原が目的タンパク質自身である場合は、目的タンパク質そのものを用いることができる。タグとして用いる抗原ポリペプチドは、担体に結合している抗体に結合し得る限り、その構造は特に制限はない。

【0026】

また、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造および目的タンパク質の精製にアビジン結合担体やストレプトアビジン結合担体を用いる場合には、目的タンパク質がビオチン修飾されたタンパク質が合成されるような合成方法を用いる。具体的には、例えば、目的タンパク質をコードする鋳型を用い、ビオチン修飾されたアミノ酸を含む上記のタンパク質合成方法等が挙げられる。

【0027】

また、必要であれば、アフィニティ担体による目的タンパク質の精製後に、タグを目的

タンパク質から分離するための構造を有する鑄型を用いることができる。具体的には、プロテアーゼ認識配列がタグと目的タンパク質との間に挿入されたタンパク質をコードする鑄型を用いることができる。プロテアーゼ認識配列とは、具体的には、例えば、PreScissionTMProtease（アマシャムバイオサイエンス社）認識配列等が挙げられる。

【0028】

(3) 目的タンパク質の精製

かくして得られる合成反応液を、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を製造する際に用いたアフィニティ担体で精製することにより、目的タンパク質を高度に精製することができる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を製造する際に用いたアフィニティ担体と目的タンパク質の精製に用いるアフィニティ担体は、同様の物質を吸着する性質を有するものであれば十分であり、全く同一のものである必要はない。アフィニティ担体を用いる目的タンパク質の精製は、それ自体既知の各アフィニティ担体に適した方法を用いることができる。ここで、アフィニティ担体の平衡化用緩衝液および溶離用緩衝液に、5～20 mMのイミダゾール等のイミダゾール環を有する化合物あるいはその誘導体を添加することによれば、アフィニティ担体への非特異的吸着を防止することができ、目的タンパク質の精製効率をさらに上昇させることができる。

【0029】

上記アフィニティ担体に吸着後、適当な方法で溶出された目的タンパク質は、例えば、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動などを用いて分離し、CBB染色などにより確認することができる。

【実施例】

【0030】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

なお、以下の実施例において、minは分、lはリットル、mlはミリリットル、Mはモル／リットル、mMはミリモル／リットル、μgはマイクログラムをそれぞれ表す。

実施例 1 ワーリングブレンダーによる微粉碎抽出

北海道産のチホク小麦（未消毒）を用い、WO02/295377号公報の実施例に記載の方法に準じて、胚芽を分離し、胚芽の純度（任意のサンプル1gあたりに含まれる胚芽の重量割合）が98%以上になるまで選別した。得られた小麦胚芽50gを、4℃の蒸留水中に懸濁し、超音波洗浄器を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次に、ノニデット（Nonidet）P40の0.5容量%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄して胚乳分を除去した小麦胚芽を得た。

【0031】

次いで、以下の操作を4℃で行い、小麦胚芽抽出液を得た。まず洗浄した小麦胚芽を抽出Buffer（HEPES-KOH（pH7.8）80mM、酢酸カリウム200mM、酢酸マグネシウム10mM、塩化カルシウム4mM、L型アミノ酸20種類各0.6mM及びジチオスレイトール8mM）100mlとともにワーリングブレンダーに入れ、回転数5000～20000rpmで30秒粉碎した。ブレンダー内壁に付着した胚芽等をかき落とした後、再び5000～20000rpmで30秒粉碎する作業を2回行った。得られた胚芽粉碎物の粒径分布をレーザー散乱方式粒度分布装置（堀場製作所製LA-920）を用いて測定した。

【0032】

得られた抽出液と粉碎胚芽の混合物を遠心管に移し30000g、30分間の遠心をかけ上清を採取した。これをさらに30000g、30分間の遠心をかけ上清を採取する操作を5回繰り返し、濁りのない上清を得た。これを、あらかじめBuffer（HEPES-KOH（pH7.8）40mM、酢酸カリウム100mM、酢酸マグネシウム5mM、L型アミノ酸20種類各0.3mM及びジチオスレイトール4mM）で平衡化しておいたセファデックスG-25カラムでゲルろ過を行った。得られた液を30000g、12分間の遠心をかけ上清を採取し、限外ろ過膜を使用して濃縮を行った。これを小麦胚芽抽

出液とした。試料の濃度は、260nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が 1.80~2.50 ($A_{260}/A_{280}=1.5$ 程度) になるように調製した。

【0033】

実施例 2 金属キレート担体カラムによるコムギ胚芽抽出液処理

(1) 金属キレート担体カラムの平衡化

金属キレートカラム担体である Talon Metal Affinity Resin 50% 溶液 (クローンテック、BD Biosciences 社製) : 100 μ l をスピンカラムに添加して、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、カラム担体に含まれる保存 Buffer を除去した。次に、保存 Buffer を除去した担体にコムギ胚芽抽出液を作製する際に使用した Buffer (HEPES-KOH (pH 7.8) 40 mM、酢酸カリウム 100 mM、酢酸マグネシウム 5 mM、L 型アミノ酸 20 種類各 0.3 mM 及び ジチオスレイトール 4 mM) : 500 μ l を添加して、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、Buffer を除去した。これを 3 回繰り返して、担体の平衡化を行った。

【0034】

(2) 金属キレート担体カラムによるコムギ胚芽抽出液処理

上記 (1) で平衡化を行ったカラム担体に対して実施例 1 で作製したコムギ胚芽抽出液 : 50 μ l を添加し、26℃、30 min インキュベートし、コムギ胚芽抽出液の内在性の金属キレート担体に吸着するタンパク質の吸着を行った。その後、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、内在性の金属キレート担体に吸着するタンパク質を除去したコムギ胚芽抽出液を作製した。

【0035】

(3) 金属キレート担体カラム処理コムギ胚芽抽出液と未処理コムギ胚芽抽出液の液組成調整

上記の条件で処理を行ったコムギ胚芽抽出液と実施例 1 で作製したコムギ胚芽抽出液の液組成を最終濃度 30 mM HEPES-KOH, pH 7.8、100 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.5 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.4 mg/ml クレアチンキナーゼ、0.380 mM スペルミジン、20 種類の L 型アミノ酸 (各 0.3 mM) になるように調整した。その後液組成を調整したコムギ胚芽抽出液を 260 nm での吸光度が 75 Abs になるように Buffer (30 mM HEPES-KOH, pH 7.8、100 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.5 mM ジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸、0.4 mg/ml クレアチンキナーゼ、0.380 mM スペルミジン、20 種類の L 型アミノ酸 (各 0.3 mM)) を用いて調節した。

【0036】

実施例 3 金属キレート担体カラム処理コムギ胚芽抽出液と未処理コムギ胚芽抽出液でのタンパク質合成比較

実施例 2 で調整した 2 種類のコムギ胚芽抽出液 40 μ l に対して (i) GFP 遺伝子をコードする mRNA と (ii) アミノ基末端側にヒシチジン 10 個の遺伝子配列とその下流に PreScissionTM Protease (アマシャム バイオサイエンス社) 認識配列とその下流に JSP-1 構造遺伝子の 1 番目のメチオニンから 163 番目のグルタミン酸までの遺伝子をコードする mRNA の 2 種類を用いてタンパク質合成を行った。

【0037】

(1) 鋳型の調製

(i) N-His-JSP-1 (1-163) / pEU

SP6 プロモーター配列およびリボソーム結合配列を 5' → 3' の順に含むオリゴ DNA (配列番号 1) を化学合成により取得した。また、JSP-1 (GenBank Accession No. AF424702) を鋳型として、5' センス側のプライマーとして、ヒスチジンタグをコードする配列と PreScissionTM Protease (アマシャム バイオサイエンス社) 認識配列、さらにその下流に JSP-1 の 5' 端の配列を含むオリゴ DNA (配列

番号2) 用い、3' アンチセンス側プライマーとして、5' 末端にSfi Iサイトを付加したJSP-1の163番目のグルタミン酸までを増幅することができるオリゴDNA (配列番号3) を用いてPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片をSfi Iで切断した(以下、これを「JSP-1断片」と称することがある)。

【0038】

タンパク質合成用ベクターであるpEU3b (Sawasaki, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(23), 14652-14657(2002)) からSP6プロモーター配列、 Ω 配列およびマルチクローニングサイトを除去して、Nae IおよびSfi Iサイトを付加した。このベクターをNae Iで切断し、上記で取得した配列番号1で示されるDNA断片とライゲーションを行った。このプラスミドをpEUbluntとした。pEUbluntをSma IおよびSfi Iで切断し、上記JSP-1断片とライゲーションした。得られたプラスミドをN-His-JSP-1 (1-163) / pEUとした。

【0039】

(ii) GFP / pEU

緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードするDNA配列が含まれるプラスミド (Plasmid-pCaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3' (25)、Haas, J. et al., Curr. Biol., 6(3), 315-324(1996)) を鋳型として、配列番号4および5に記載の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行った。増幅されたDNA断片をSfi Iで切断し、pEUbluntをSma IおよびSfi Iで切断したものとライゲーションを行った。得られたプラスミドをGFP / pEUとした。

【0040】

(2) タンパク質合成

上記(1)で調製したGFP / pEU、N-His-JSP-1 (1-163) / pEUを鋳型として、SP6 RNA polymerase (Promega社製) を用いて転写を行い、得られたRNAをエタノール沈殿により定法に従い精製して用いた。

【0041】

実施例2で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して上記mRNAをそれぞれ2.0 mg / mlの濃度で含む翻訳反応溶液 (30 mM HEPES-KOH, pH 7.8、100 mM酢酸カリウム、2.65 mM酢酸マグネシウム、2.5 mMジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mMクレアチンリン酸、0.4 mg / mlクレアチンキナーゼ、0.380 mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM) 20 μ l) を調製した。

【0042】

この翻訳反応溶液を透析膜に入れ、Buffer (30 mM HEPES-KOH, pH 7.8、100 mM酢酸カリウム、2.65 mM酢酸マグネシウム、2.5 mMジチオスレイトール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mMクレアチンリン酸、0.380 mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸 (各0.3 mM) 2.5 ml) を透析外液として用い、26℃で24時間タンパク質合成反応を行った。

【0043】

反応後のタンパク質合成溶液: 1 μ lをSDS-PAGEにより分離し、CBB染色して合成物を確認した。この結果を図1に示す。図中レーン1はマーカを示し、レーン2はコントロールのクレアチンキナーゼ、レーン3は未処理コムギ胚芽抽出液を用いてN-His-JSP-1を合成した反応液、レーン4は金属キレート担体カラム処理コムギ胚芽抽出液を用いてN-His-JSP-1を合成した反応液、レーン5は未処理コムギ胚芽抽出液を用いてGFPを合成した反応液、レーン6は金属キレート担体カラム処理コムギ胚芽抽出液を用いてGFPを合成した反応液の結果を示す。図から明かなように、金属キレート担体カラムで処理を行ったコムギ胚芽抽出液は、未処理のコムギ胚芽抽出液と比べて著しく低い合成活性は示さず、ほぼ同等であった。

【0044】

実施例4 各タンパク質合成溶液の金属キレート担体カラムでの精製比較

(1) 金属キレート担体カラムの平衡化

金属キレートカラム担体であるTalon Metal Affinity Resin 50%溶液(クローンテック、BD Biosciences社製): 100 μ lをスピнкаラムに添加して、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、カラム担体に含まれる保存Bufferを除去した。次に保存Bufferを除去した担体にWash Buffer (HEPES-KOH (pH 7.8) 30 mM、塩化ナトリウム300 mM、グリセロール10%、イミダゾール10 mM及び β メルカプトエタノール2 mM): 500 μ lを添加して、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返し、担体の平衡化を行った。

【0045】

(2) 金属キレート担体カラムによるタンパク質合成液の精製

上記(1)で平衡化を行ったカラム担体に対して、実施例3(2)に記載したように、N-His-JSP-1(1-163)のmRNAを鋳型として、金属キレート担体カラム処理コムギ胚芽抽出液を用いて合成反応を行った反応溶液、および未処理のコムギ胚芽抽出液を用いて合成反応を行った反応溶液を、それぞれ50 μ l添加し、4℃、60 minインキュベートし、タンパク質合成液の金属キレート担体への吸着を行った。その後、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、吸着しなかった翻訳反応溶液を除去した。その後、Wash Buffer (HEPES-KOH (pH 7.8) 30 mM、塩化ナトリウム300 mM、グリセロール10%、イミダゾール10 mM及び β メルカプトエタノール2 mM): 500 μ lを添加して、3000 rpm、1 min、4℃で遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返し、担体への非特異に吸着しているタンパク質の洗浄を行った。洗浄を行ったカラム担体に対してElution Buffer (HEPES-KOH (pH 7.8) 30 mM、塩化ナトリウム300 mM、グリセロール10%、イミダゾール400 mM及び β メルカプトエタノール2 mM) 50 μ lを添加し、4℃、10 minインキュベートし、金属キレート担体吸着したタンパク質の溶離を行った。

【0046】

溶離後のタンパク質合成溶液: 1 μ lをSDS-PAGEで分離し、これをCBB染色して、精製を確認した。この結果を図2に示す。図中、レーン1は分子量マーカー、レーン2はコントロールのクレアチンキナーゼ、レーン3は金属キレート担体吸着を行わないコムギ胚芽抽出液を用いてタンパク質合成を行った後に、同じ金属キレート担体を用いて精製を行った結果を示し、レーン4は金属キレート担体吸着を行ったコムギ胚芽抽出液を用いてタンパク質合成を行った後に、同じ金属キレート担体を用いて精製を行った結果を示す。

【0047】

これらの結果が示すように、金属キレート担体カラムで処理を行ったコムギ胚芽抽出液精製結果では精製目的のタンパク質(アミノ基末端側にヒシチジン10個の遺伝子配列とその下流にPreScissionTM Protease (アマシャム バイオサイエンス社) 認識配列とその下流にJSP-1構造遺伝子の1番目のメチオニンから163番目のグルタミン酸)だけの状態になっており、未処理のコムギ胚芽抽出液精製結果では精製目的のタンパク質以外にコムギ胚芽抽出液由来のタンパク質が精製溶液中に含まれていることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明によって改良された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いたタンパク質合成を行い、得られたタンパク質を細胞抽出液を製造する際に用いたアフィニティ担体を用いて精製することにより、高度に精製された目的タンパク質を取得することができる。この方法によれば、アフィニティ担体カラムのベッドボリュームを小さくすることができるため、目的タンパク質の濃縮も可能となり、無細胞タンパク質合成系において合成量が少ないタンパク質の回収にも、非常に有益である。さらに、高度に精製されたタンパク質を必要とするタンパク質立体構造解析やタンパク質機能解析等にも高純度の目的タンパク質を

大量に供給することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0 0 4 9】

【図 1】 アフィニティ担体による吸着処理を行ったコムギ胚芽抽出液と未処理のコムギ胚芽抽出液を用いて翻訳反応を行ったときの目的タンパク質合成量を示す電気泳動写真である。

【図 2】 アフィニティ担体による吸着処理を行ったコムギ胚芽抽出液と未処理のコムギ胚芽抽出液を用いて翻訳反応を行った後に、同じアフィニティ担体で精製を行ったタンパク質を示す電気泳動写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZOEGENE Corporation

<120> Method for producing cell extract for Cell-free protein synthesis

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 1

gccggccgat ttaggtgaca ctatagaaca tcaacatctt acattttaca ttataatttt
cactctctat ttttttttac attaacaaca tttttagg

98

<210> 2

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 2

atgcatcatc atcatcatca tcatcatcat catagcagcg gccatctgga
agttctgttc cagggcccta tggggaatgg gatgaacaa

89

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 3

ggcctttttg gcctcattct gcacccctgca aagggc

36

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 4

atggtgagca agggcgagga

20

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

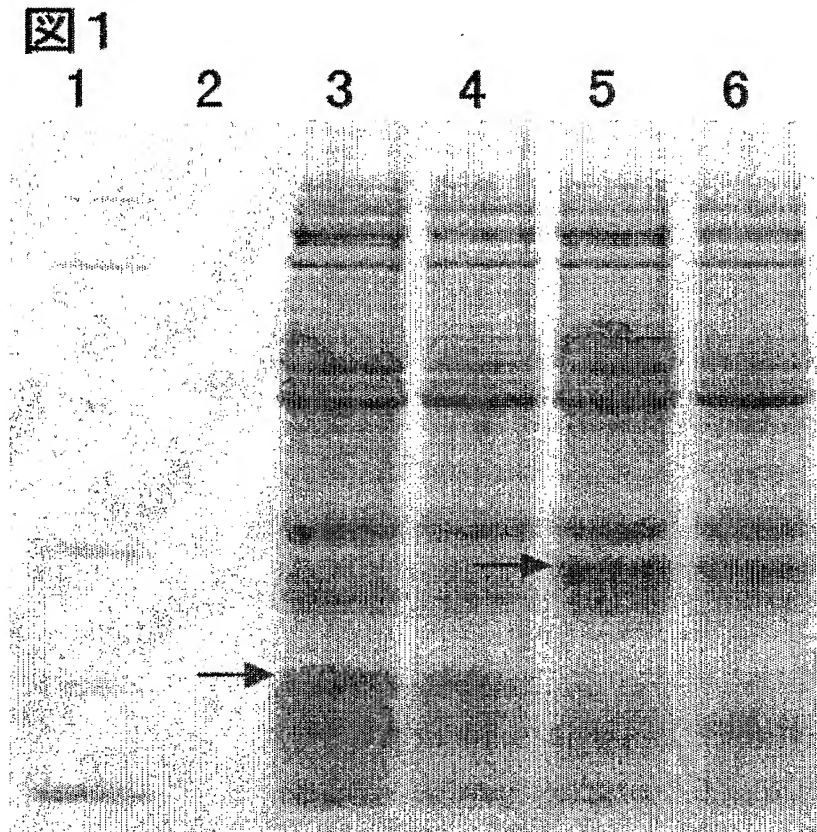
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 5

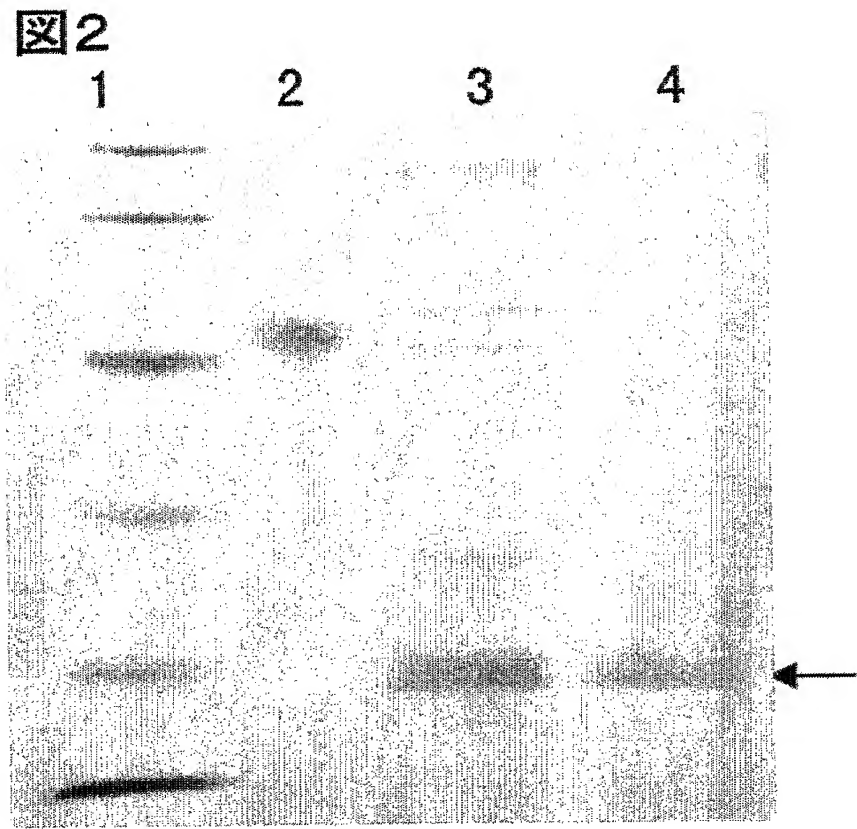
ggcctttttg gccttacttg tacagctcgt cca

33

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 本発明は、高度な精製効率を有するタンパク質の精製方法を提供することを課題とする。さらに詳細には、高度な精製効率を有する精製方法を実現するための無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、該細胞抽出液を用いるタンパク質合成方法、並びに該細胞抽出液により合成されたタンパク質を精製する高度な精製効率を有する精製方法の提供を課題とする。

【解決手段】 タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から、精製に用いるアフィニティ担体と結合する物質を排除した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を製造し、該無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いて目的タンパク質を合成した後に、目的タンパク質を該アフィニティ担体を用いて精製する。

特願 2 0 0 4 - 0 5 7 3 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 2 6 2 4 6 9]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 7 月 1 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地

氏 名

ゾイジーン株式会社